

Opinnäytetyö (AMK)

Bio –ja elintarviketekniikka

Bioteekniikka

2011

Tiina Kelanne

# COXSACKIEVIRUS A9 – KANTOJEN MUUNTUMINEN

VP1- ja 3D-geenien sekvensointi  
rekombinaatioiden tunnistamiseksi



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

Turun ammattikorkeakoulu

Bio –ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

Syksy 2011 | Sivumäärä 20

Ohjaaja(t) Petri Susi, Tony Wahlroos, FT Ilari Suominen

Tiina Kelanne

## COXSACKIEVIRUKSEN VP1- JA 3D-GEENIEN SEKVENSOINTI JA EVOLUTIIVINEN ANALYYSI

Työn tarkoitus oli tutkia aivokalvontulehdusta aiheuttavan enteroviruksen (coxsackievirus A9; CAV9) sekvenssejä ja tehdä havaintoja CAV9-viruksen evoluutiosta ja rekombinaatiotapahtumista. Työssä tutkittiin erityisesti sellaisia geenialueita (VP1 ja 3D), joissa muutoksia oletetaan tapahtuvan. Työssä sekvensoitiin virus-RNA:n VP1- että 3D-alueita, jotka oli ensin muutettu DNA-muotoon RT-PCR-reaktiossa ja sitten puhdistettu agaroosigeeliltä. RT-PCR optimoitiin ennen varsinaisten näytteiden analysointia. Työssä tuotettiin yhteensä 160 kpl VP1- ja Y kpl 3D-sekvenssejä.

ASIASANAT:

Enterovirus, RT-PCR, PCR, agaroosigeeli, geenineristäminen

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

Fall 2011 | Total number of pages 20

Instructor Petri Susi, Tony Wahlroos, Ph.D., Ilari Suominen, Ph.D.

Tiina Kelanne

## SEQUENCING AND EVOLUTIONARY ANALYSIS OF COXSACKIEVIRUS VP1 AND 3D GENES

The purpose of this thesis was to study the sequences of an Enterovirus (coxsackievirus A9; CAV9) which causes meningitis, and discover its evolution and recombination transactions. Especially those genes (VP1 and 3D) were studied where changes were expected. The VP1 and 3D areas of virus RNA's were sequenced after they had been converted to DNA format first by RT-PCR reaction and then by purification off agarose gel. The RT-PCR reaction was first optimized before actual samples were analyzed. In all, 160 VP1 and 3D sequence's were produced in this thesis project.

### KEYWORDS:

Enterovirus, RT-PCR, PCR, agarose gel



# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET (TAI) SANASTO</b>	<b>6</b>
<b>1 PIKORNAVIRUKSET YLEISESTI</b>	<b>6</b>
1.1 Enterovirukset	6
1.2 Coxsackievirus A9 (CAV9)	6
<b>2 TAUSTAA</b>	<b>7</b>
<b>3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>8</b>
3.1 Näytteet	8
3.2 RT-PCR	9
3.3 PCR	9
3.4 Agaroosigeelielektroforeesi	10
3.5 DNA:n puhdistus	11
3.6 Puhdistetun DNA:n tarkastelu	11
3.7 Sekvensointi	11
<b>4 TULOKSET</b>	<b>11</b>
<b>5 TARKASTELU</b>	<b>16</b>
<b>6 TULEVAISUUS</b>	<b>17</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>17</b>

## LIITTEET

Liite 1. Sekvensointituloksia

## KUVAT

Kuva 1. Coxsackievirus A9 (CAV9)	7
Kuva 2. CAV9, genominen järjestys	8
Kuva 3. Agaroosigeelipuhdistus 3Dpol näytteistä	13
Kuva 4. Agaroosigeelipuhdistus VP1 näytteistä	13
Kuva 5. Puhdistettu DNA, 3Dpol	15
Kuva 6. Puhdistettu DNA, VP1	15

## TAULUKOT

Taulukko 1. Alukkeiden sekvenssit	8
Taulukko 2. CAV9 Kliiniset näytteet	
Taulukko 3. cDNA Master-mix	

## KÄYTETYT LYHENTEET (TAI) SANASTO

3Dpol	Alue, joka katalysoi entsyymejä
IAS	Inner antisense
IS	Inner sense
OAS	Outer antisense
OS	Outer sense
RGD	Viruksen sitoutumiseen isäntäsoluun vaikuttava alue
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction, PCR-reaktiotyyppi, jossa monistuskohde on RNA:ta.
VP1	Alue, joka toimii viruksen adheesiossa solun pintaan

# 1 PIKORNAVIRUKSET YLEISESTI

Pikornavirukset kuuluvat *Picnaorviridae*-heimoon ja ne jaetaan yleisesti 12 sukuun. Nämä suvut ovat Enterovirukset, Cardiovirukset, Aphotovirukset, Hepatovirukset, Parechovirukset, Erbovirukset, Kobuvirukset, Teschovirukset, Sapelovirukset, Senecavirukset, Tremivirukset ja Avihepatovirukset. Pikornavirukset ovat pieniä vaipattomia viruksia, joiden genomi muodostuu yksisäikeisestä RNA-molekyylistä. Tunnetuimpia pikornaviruksia ovat muun muassa ihmisillä esiintyvät poliovirus ja hepatiitti A-virus.

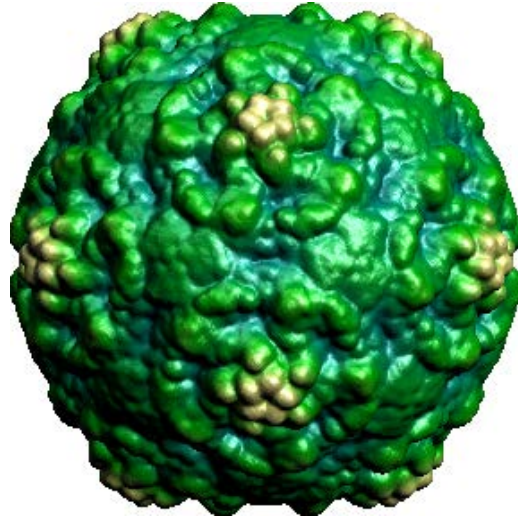
## 1.1 Enterovirukset

Enterovirukset jaetaan neljään lajiin, ja ne on nimetty A:sta D:hen. Erilaisia serotyyppejä on löydetty yli 100. Enterovirukset ovat yksisäikeisiä, positiivisesti varautuneita viruksia, joilla on suuri mutatoitumistaso. Johtuen siitä, että niillä on heikko virheidenkorjausmekanismi. Enterovirukset ovat yleisin virusryhmä, joka aiheuttaa sairauksia ihmisissä. Ne diagnosoidaan yleisesti viljelemällä näytteitä eläinsoluissa. Geneettinen tyypitys RT-PCR:llä on noussut tärkeään rooliin pikornavirusdiagnoosiin, koska Picornaviruksia on niin suuri määrä, että serotyyppitystä ei voida tehdä.

## 1.2 Coxsackievirus A9 (CAV9)

Coxsackievirus A9 (CAV9) (Kuva 1.) kuuluu Enterovirusten sukuun ja Ihmisen enterovirus B -lajiin. Se on merkittävä ihmisille sairauksia aiheuttava patogeeni, joka aiheuttaa muun muassa infektoita keskushermostossa ja sydänlihaksessa. CAV9-virus aiheuttaa myös pahoinvointia ja ripulia. CAV9 on myös kliinisesti tärkeimpiä enteroviruksia aiheuttaen epideemisiä infektoita (1.). CAV9 kuuluu poikkeukselliseen joukkoon enteroviruksia, että se sitoutuu solupinnan integriini-reseptoreihin tunkeutuessaan soluun (2.). Viruksen elinkiertoa hiirissä on niinkään tutkittu suhteessa sen kykyyn käyttää integriini-reseptoreita (3,4), mutta ei tiedetä, johtaako tämä eroavaisuuksiin suhteessa muihin enteroviruksiin,

jotka aiheuttavat vastaavanlaisia tauteja. CAV9-viruksen genomin pituus on 7.5 kb ja sillä on pikornaviruksille tyypillinen ikosahedraalinen rakenne (2).



Kuva 1. Cocksackievirus A9 (CAV9) (5.)

## 2 TAUSTAA

Työssä tutkittiin CAV9-viruskantojen muuntumista näytteillä, jotka oli kerätty 60 vuoden ajalta muun muassa Euroopasta ja Pohjois-Amerikasta. Työn tarkoituksena oli ensin sisäanjaa uusi RT-PCR-menetelmä VP1- ja 3Dpol-alueiden monistamiseksi ja käyttää sitä em. virusnäytteiden analysointiin; VP1- ja 3D-alueet sekvensoitiin fylogeneettisiä tutkimuksia varten. VP1-alue tuottaa proteiinia, joka osallistuu viruksen tarttumiseen isäntäsoluun, ja 3Dpol-alue tuottaa proteiinia, joka katalysoi entsyymejä. Nämä alueet ovat tyypillisiä vertailtavia, kun halutaan verrata virussekvenssien muuntumista (3).

Alukkeina käytettiin molemmissa alueissa RT-PCR:ssä ja sen jälkeisessä tavallisessa PCR:ssä OS ja OAS (Taulukko 1.). Alukkeen tehtävänä reaktiossa on toimia aloitusjaksona. Työssä käytetyt alukkeet HEVB-3Dpol OS ja OAS ovat molemmat 26 bp pituisia.

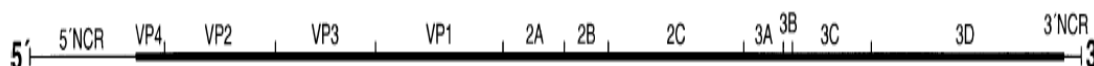


Taulukko 1. Alukkeiden sekvenssit

OS	GGYGGYACHCCCCANAARAGAATGCT
OAS	TCRTCYYTBACRTADGTYACCATTGG
IS	AARAGAATGCTYATGTAYAAYTTYCC
IAS	ARDCCRTAYTTRTCCATRCAYTCYTT

Koska sopivia kaupallisia alukkeita oli saatavan, ei ollut tarpeellista valmistaa niitä itse.

Työssä käytettävät virusnäytteet olivat valmiina. Potilaasta keräämisen jälkeen, viruksia kasvatettiin eläinsoluilla. Kun oli saavutettu haluttu pitoisuus virusta, eristettiin RNA. RNA:n eristämisen jälkeen näytteet säilytettiin pakastettuina jatkotutkimuksia varten. Lopputuloksena käytettävät näytteet olivat vain viruksen RNA:ta.



Kuva 2. CAV9, genominen järjestys

### 3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

#### 3.1 Näytteet

Taulukko 2. Esimerkki näytetaulukosta

NÄYTENUMERO	VUOSI	SUKUPUOLI	OIREET	VP1	3Dpol
70-15888	1976	Mies	Aivokalvontulehdus Kouristukset,	OK	OK
77-1695	1977	Mies	kuume	OK	OK
63-7506	1974	Nainen	Kuume, oksentelu	OK	OK

Ennen työn aloittamista työstettiin taulukkoa, johon oli merkitty näytenumero, vuosi, sukupuoli, oireet ja paljon muuta tietoa näytteestä ja sen antajasta. Näytteitä oli yhteensä 103 kappaletta. Taulukkoon lisättiin kohdat VP1 ja 3Dpol alueille, joihin lisättiin työn päättyessä merkintä kyseisen alueen onnistumisesta.

Työn valmistuttua taulukkoa päivitettiin myös muiden muuttuneiden tietojen osalta. Esimerkiksi päivitettiin tieto jäljelle jääneestä näytemäärästä.

### 3.2 RT-PCR

RT-PCR on yleisesti käytetty laboratiomenetelmä, jossa halutaan tuottaa DNA:ta RNA:sta. Koska tutkittava virus on RNA:ta RT-PCR menetelmä sopii sen monistamiseksi hyvin. RT-PCR:ssä RNA käännetään ensimmäiseksi cDNA:ksi. cDNA, komplementaarinen DNA, on RNA:sta käänteisesti valmistettua DNA:ta. cDNA:a voidaan käyttää tavallisessa PCR:ssä monistettavana alueena, jolloin tuotteena saadaan DNA:ta.

### 3.3 PCR

PCR, eli polymeerasiketjureaktio, on menetelmä jota käytetään kun halutaan monistaa DNA-jaksoa (6). Sitä voidaan käyttää kun halutaan monistaa yksittäistä geeniä tai mitä tahansa DNA-pätkää. Sen avulla saadaan pienimäärä DNA:ta monistumaan eksponentiaalisesti. Menetelmää käytetään muun muassa perinnöllisten sairauksien etsimiseen, geneettisten sormenjälkien tunnistamiseen, infektiosairauksien diagnosoimiseen ja geenien kloonaukseen. Menetelmä on kehitetty jo 1980 luvulla, mutta se yleistyi vasta saman vuosikymmenen lopulla.

PCR –reaktiot tehdään pienissä mikrosentrifuugiputkissa, joiden lämpötilaan tarkkaillaan ja vaihdellaan erityisellä PCR –laitteella. Jokaisessa PCR –reaktiossa on mukana erityinen lämpöä kestävä polymeerasi –entsyymi, sekä kaksi tarkalleen tunnettua aluketta, jotka sitoutuvat kaksinauhaiseen DNA:n eri juosteisiin alueen vastakkaisiin päihin. Alukkeiden väliin jäävä DNA-jakso on se, jota monistetaan. Seoksessa tulee olla mukana myös nukleotideja, jotka muodostavat uutta DNA:ta. Monistettavaa kaksinauhaista DNA juostetta kutsutaan templaatiksi.

PCR –reaktion koostuu erilaisista jaksoista, joita toistetaan haluttu määrä. Reaktion alkaa siitä, että templaattina toimiva DNA denaturoidaan lämpötilaa nostamalla, mikä aiheuttaa DNA juosteiden eroamisen toisistaan. Alukkeet

kiinnittyvät juosteisiin, niiden komplementaarissiin kohtiin, kun lämpötilaa vähän nostetaan. Polymeraasi –entsyymi alkaa kiinnittämään nukleotidejä alukkeen 3' päästä lähtien templaatin mallin mukaisesti, kun lämpötilaa nostetaan edelleen. Näin saadaan aikaan kaksijuosteista DNA –monistetta, joka denaturoidaan jälleen yksijuosteiseksi, jolloin aloitetaan uusi sykli.

### 3.4 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesi, eli AGE, on menetelmä, jota käytetään kun halutaan analysoida DNA-molekyylejä, jotka ovat pituudeltaan 0,1 - 50 kb. Menetelmässä käytettävä agarosi on polysakkaridi, jota eristetään merilevästä. Agarosi saadaan liukenemman kiehauttamalla se veteen (6). Nukleeenit ovat fosfaattiryhmiensä ansiosta luonnostaan happamia, joten joutuessaan sähkökenttään ne kulkeutuvat positiivista napaa, eli anodia kohden. Agarosi hidastaa DNA:n kulkeutumista napaa kohden, ja siitä johtuen pienemmät DNA-molekyylit kulkeutuvat napaa kohden nopeammin kuin isot DNA-molekyylit. Tästä johtuen eri mittaiset DNA-molekyylit erottuvat ajon aikana omiksi vyöhykkeiksi. Vyöhykkeitä kutsutaan bändeiksi.

DNA:ta ei voi nähdä geelistä sellaisenaan, vaan se pitää värjätä. Yleisesti käytetty väriaine on etidumbromidi (EtBr). Etidiumioni tunkeutuu nukleeenihappojen emästen väliin. UV valossa emäkset absorboivat UV-säteitä ja luovuttavat energian etidiumille, joka fluoresoi oranssinpunaisena.

AGE –menetelmässä käytetty laite koostuu ajoaltaasta, altaan pohjalla kummassakin päässä olevista elektrodeista ja turvakannesta. Laitteeseen kuuluu myös geelialusta, johon sulageeli kaadetaan ja jähmetetään. Haluttujen kokoisten kaivojen aikaan saamiseksi geelialustalla käytetään näytekampaa. Ajon aikana valettu geeli on kokonaan ajopuskurin alla.

Koska ajo tapahtuu nesteessä on tärkeää lisätä ajopuskuria raskaampaa ainetta näytteisiin. Näytepuskuri sisältää myös yleensä jotain väriä, joka helpottaa näytteen pipetoimista kaivoon sekä ajon etenemisen seuraamista.

### 3.5 DNA:n puhdistus

DNA:n puhdistus täytyy suorittaa, jotta päästään eroon epätoivotuista aineista, joita käytetty agarosigeeli sisältää. DNA saadaan kiinnittymään erityisen sitovan puskurin avulla silicakalvoon. Epäpuhtaudet, kuten suolat ja makromolekyylit, eivät tartu menetelmässä käytettyyn silicakalvoon. Viimeiseksi puhdas DNA eluoidaan haluttuun tilavuuteen. Tilavuus vaikuttaa DNA:n konsentraatioon liuoksessa.

### 3.6 Puhdistetun DNA:n tarkastelu

Puhdistettua DNA:ta voidaan tarkastella käyttäen AGE-menetelmää.

### 3.7 Sekvensointi

Sekvensoinnin tarkoituksena on selvittää tutkittavan DNA alueen nukleotidijärjestys (6). Jokaisen potilasnäytteen nukleotidijärjestyksen myötä voidaan selvittää miten kyseinen alue vaihtelee. Sekvensoinnin suorittamiseksi tarvitaan erityinen laite, jota ei ollut saatavilla työn suorittamispaikassa. Siitä syystä sekvensointi päätettiin suorittaa ulkopuolisella taholla. Ulkopuolisena tahona käytettiin Turussa sijaitsevaa Biotekniikan keskusta. Sekvensointi suoritettiin Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer –laitteella, jonka toiminta perustuu siihen, että eri nukleotidit värjätään omalla värillään, ja sen jälkeen ne mitataan fluoresenssia käyttäen. Eri värit tuottavat erimäärän valoa, jonka avulla tulkitaan nukleotidi.

## 4 TULOKSET

Työ aloitettiin 3Dpol alueen työstämisellä potilasnäytteistä. Aluksi näytteitä käsiteltiin 8 kappaletta kerrallaan. Kun työhön saatiin rutiinia, muutaman viikon kuluttua näytemäärä oli kerrallaan 18 kappaletta.

RT-PCR:ssä ensimmäiseksi valmistettiin Master-Mix (Taulukko 3.), joka koostui 5x ImProm II-puskurista, 25mM MgCl<sub>2</sub>:sta, 10 mM (kutakin ) dNTP:stä, Rnaasi-

inhibiittorista, RT-entsyymistä ja alukkeista (Taulukko2.). Koska työssä käsiteltiin virus RNA:ta oli tärkeää tunnistaa sen mahdolliset patogeeniset vaikutukset. Kaikki RT-PCR reaktion työvaiheet suoritettiin vetokaapissa, joka desinfioitiin huolellisesti ennen ja jälkeen työvaiheiden. Reagensseja ja valmista Master-Mixiä säilytettiin työvaiheiden aika jäähauteessa, koska reaktion haluttiin alkavan vasta lämpöhauteessa. Master-Mix jaettiin eppendorf-putkiin, joihin oli pipetoitu näyte RNA. RT-reaktio tapahtui +42 °C lämpöhauteessa 60 minuutin ajan.

VP1 alueiden työstäminen aloitettiin, kun oltiin saatu eristettyä 3Dpol kaikista potilasnäytteistä. Työ vaiheet ja menetelmät olivat samoja, kuin mitä käytettiin 3Dpol alueiden kanssa, erona oli vain se, että käytettävät alukkeet olivat erit.

RT-PCR:n tuloksena syntyi cDNA:ta, eli komplementaarista DNA:ta. Valmistettiin PCR reaktiota varten liuos, joka koostui ddH<sub>2</sub>O:ta, puskurista, 20 mM dNTP:tä, 5' ja 3' alukkeista sekä Dynazymestä. RT-PCR tuotteet pipetoitiin mikrosentrifuugiputkiin ja päälle pipetoitiin PCR liuos. Pipetointi suoritettiin jäähauteessa, jotta PCR reaktion ei päässyt alkamaan. PCR laiteeseen tehtiin halutunlainen ohjelma PCR-ajo-olosuhteille.

Taulukko 3. cDNA Master-mix

Reagenssi	Määrä µl (lopullinen konsentraatio)
5 x Improm II-puskuri	2 (1x)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1 (2,5 mM)
10mM DNTP (kutakin)	0,5 (0,5mM)
RNAasi inhibiittori	0,5
RT-entsyymi: <b>ImProm II</b>	0,5
Primeri 10 µM OAS	1 (1µM)
RNA	4,5
<b>Total</b>	10

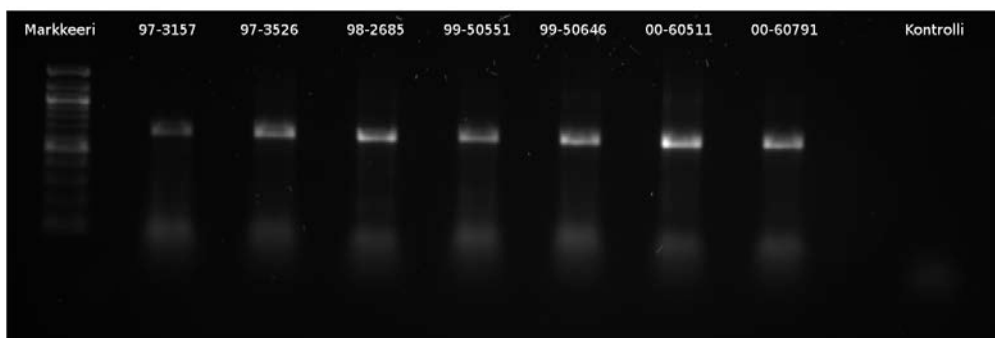
Taulukko 4. PCR Reaktioseos

Reagenssi	Määrä µl
RT-reaktiosta	5
ddH <sub>2</sub> O	9,5
5 x puskuri	5
20 mM DNTTP	0,25
10 µM 5'aluke	2,5
10 µM 3'aluke	2,5
Dynazyme	0,25
<b>Total</b>	<b>25</b>

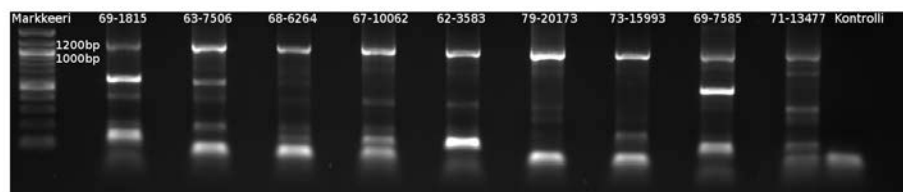
Taulukko 5. PCR-ajo-olosuhteet

Lämpötila	Aika	
95°C	3 min	
95°C	30 s	
50°C	30 s	x40
72°C	120 s	
72°C	5 min	
4°C	∞	

PCR-stä saadut tuotteet puhdistettiin agarosigeelillä, koska haluttiin päästä eroon ylimääräisistä tuotteista.



Kuva 3. Agarosigeelipuhdistus 3Dpol näytteistä



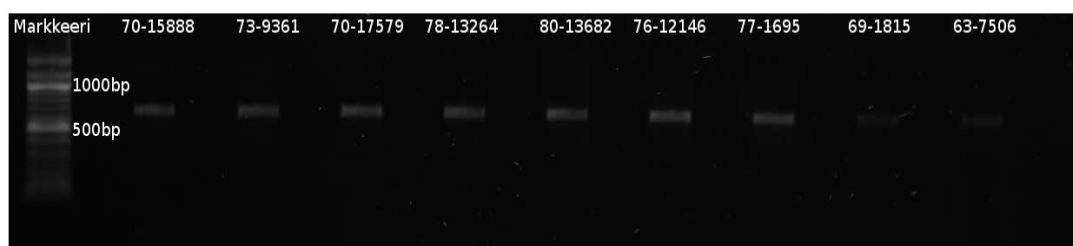
Kuva 4. Agarosigeelipuhdistus VP1 näytteistä

Valmistettiin sopivan jämäkkä agarosigeeli. Tässä työssä sopiva geelin jäykkyys saavutettiin käyttämällä 1 % agaroosia. Jokaista agarosia grammalla kohden lisättiin 100 ml TBE puskuria. Nestettä lämmitettiin mikroaaltouunissa niinkauan, että agarosia liukeni siihen. Liuosta jäähdytettiin vähän ja sen jälkeen siihen lisättiin etidiumbromidia, (0,5 µg/ml) 2,5 µl. Nestemäinen seos kaadettiin agarosigeelielektroforeesilaitteeseen sopivaan geelialustalle, johon sijoitettiin sopivan kokoisia kaivoja tuottava kampa. Geelialustan päät teipattiin kiinni, jotta seos ei päässyt valumaan pois. Seoksen annettiin jähmettyä. Kun geeli oli valmis, kampa ja teipit poistettiin varovaisesti. Geeli asetettiin ajolaitteeseen ja ajolaite täytettiin ajopuskurilla. Agarosigeelin ensimmäiseen kaivoon pipetoitiin markkeeri, joka toimi tunnettuna näytteenä ja siitä voitiin päätellä muodostuvien bändien koko. Geelille pipetoitiin valmistettuja näytteitä vain jokatoiselle kaivolle, myöhemmän työvaiheen helpottamiseksi. Viimeiseen kaivoon pipetoitiin jokaisessa reaktiossa mukana ollut kontrollinäyte. Kontrollinäyte oli muuten samanlainen kuin muutkin näytteet, mutta siihen ei ole lisätty RT-PCR:ssä RNA:ta. Ajolaite käynnistettiin ja annettiin olla päällä noin tunnin ajan. UV-pöydällä tarkasteltiin, että onko näytteet haluttua kokoa. Jos näin oli niin ajoa jatkettiin vielä selvemmän tuloksen saamiseksi. Jos UV-pöydällä geelissä ei näkynyt bändejä, ajoa ei jatkettu, koska aikaisemmassa työvaiheessa oli tapahtunut virhe. Kun ajo oli valmis, geelistä otettiin kuva UV-valossa. Työn aikana valmistettiin ja ajettiin yhteensä 35 agarosigeeliä.

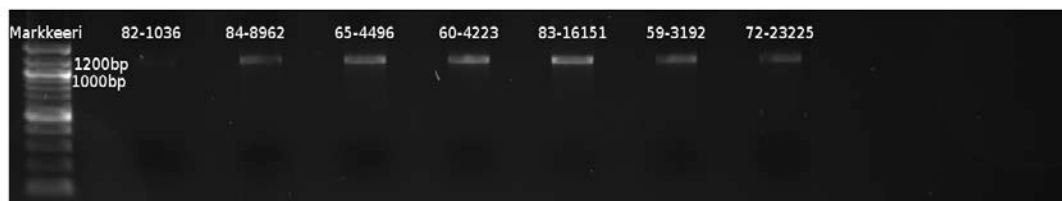
Sekvensointiin tarvittava DNA analysoitiin agarosigeelin avulla. Geeliltä leikattu bändi tuli puhdistaa, koska leikkauksen mukana tuli myös geeliä. Puhdistus suoritettiin PCR clean-up Gel extraction, MACHEREY-NAGEL, menetelmää käyttäen. Ensimmäinen vaihe oli leikata oikea bändi UV-pöydällä. Vaihe suoritettiin nopeasti, koska UV-valo vahingoittaa herkkää DNA:ta. Kun bändit oli leikattu geeliltä, ne laitettiin merkittyihin ja punnituihin eppendorf-näyteputkiin. Putket punnittiin uudestaan geelipalan lisäämisen jälkeen. Tämä tieto vaikutti siihen, kuinka paljon putkeen pipetoidaan NT puskuria. Jokaista 100 g:aa kohden agarosigeeliä lisätään 200 µl NT puskuria. Pipetoinnin jälkeen putkia inkuboitiin +50 °C:ssa 5-10 minuttia, välillä sekoittaen. Työvaihe sai aikaan sen, että agarosigeeli liukeni puskuuriin. Käytettävän kitin mukana

tuli keräys- ja erotuskolonnit. Seuraava vaihe menetelmässä oli laittaa erotuskolonne keräyskolonnin sisään ja merkitä niihin näytenumerot. Erotuskolonnein pipetoitiin inkuboinnista tulleet näytteet. Kolonnit laitettiin sentrifuugiin minuutiksi 11000 g:hen. Sentrifuugissa DNA sitoutui erotuskolonnissa olevaan silikakalvoon, ja epäpuhtaudet kulkeutuivat sen läpi. Keräyskolonnein kerääntynyt neste, flow-through, kaadettiin pois. Seuraavaksi pestiin keräyskolonnissa oleva silica kalvo. Pipetoitiin 600 µl NT3 puskuria erotuskolonnein, joka on laitettu keräyskolonnin sisään. Sentrifugoitiin putkia yhden minuutin ajan 11000 g:ssä. Toistettiin pesu ja sentrifugointi samalla tavalla ja flow-through heitettiin jälleen pois. Toistettiin vielä sentrifugointi erotuskolonnissa olevan DNA:n kuivaamiseksi. Tällä kertaa sentrifugoinnin pituudeksi valitaan 2 minuuttia. Erotuskolonnein laitettiin puhtaaseen, merkittyyn 1,5 ml microsentrifuugiputkeen. Pipetoitiin erotuskolonnein 30 µl eluointi puskuria ja inkuboitiin huoneenlämmössä 1 minuutti. Sentrifugoitiin 1 minuutti. Erotuskolonnin otettiin pois, koska puhdistettu DNA on siirtynyt sen läpi microsentrifuugiputkeen. Tarkistettiin että putkien päälle oli merkitty oikea näytenumero.

Puhdistetulle DNA:lle suoritettiin vielä agaroosigeelitarkastelu. Käytettiin samaa menetelmää kuin aikaisemminkin.



Kuva 5. Puhdistettu DNA, 3Dpol



Kuva 6. Puhdistettu DNA, VP1



Kun näytteet oli ajettu geelille, voitiin tarkastaa että onko se oikean kokoinen. Apuna käytettiin tunnettua näytettä. Näistä kuvista voitiin myös päätellä että onko DNA:n puhdistus onnistunut. Jos geelillä ei näkynyt bändiä, voitiin todeta että DNA puhdistus on epäonnistunut jossain vaiheessa. Myös aikaisempi UV-valotus on voinut aiheuttaa DNA:n tuhoutumisen. Bändi saattoi olla myös erittäin vaalean värinen. Se ei kuitenkaan tarkoittanut sitä, että näytettä ei voisi sekvensoida. Näytteet joista ei saatu tässä vaiheessa näkyvää bändiä, tehtiin uudestaan alusta alkaen. Onnistuneet näytteet säilytettiin pakkasaeessa niinkauan että kaikista muista näytteistä oli eristetty sekä 3Dpol, että VP1 alue.

Ennen sekvensointiin lähettämistä täytettiin valmis taulukkopohja, johon merkittiin näytteen nimi, käytetyt primerit ja konsentraatiot. Näytteet valmisteltiin sekvensointia varten ennen niiden viemistä sinne. Pipetointi suoritettiin jäähauteessa 96 kuoppalevyllä. Yhteen kuoppaan pipetoitiin 5 µl DNA:ta ja 1 µl alukkeita. Alukkeina käytettiin IS molemmille alueille (Taulukko 1.)

## 5 TARKASTELU

Tulokset saapuivat sähköisessä muodossa. Tuloksia tarkasteltiin silmämääräisesti, jotta nähtiin mitkä näytteet olivat onnistuneet ja mitkä ei. Onnistuneista sekvensointituloksista koottiin lista, jossa on näytenumero ja saatu sekvenssi. Liitteessä 1 on esitelty muutaman 3Dpol näytteen sekvensointitulokset.

Suurimmasta osasta sekvensointiin lähetetyistä näytteistä tuotti sekvenssituloksen. Myös epäonnistuneita tuloksia saatiin muutamia sekvenssoinnissa. Epäonnistumiseen voi olla monia syitä. Ensinnäkin, koska näytteet pipetoitiin käytettävään levyyn käsin, siinä on voinut tapahtua virhe. Pipetoitavat määrät olivat todella pieniä, niin epäonnistumisen riski on siinä tapauksessa suuri. Pipetointi on voinut tapahtua myös väärään kaivoon. Tämän virheen todennäköisyys on suuri, koska jokainen näyte otettiin omasta putkestaan, niin virheellinen pipetointi on voitu suorittaa epähuomiossa. Näytelevy kuljetettiin käsin sekvensointipaikkaan, joten tärähdys matkalla on

voinut aiheuttaa näytteen siirtymisen näytelevyä suojaavaan pintaan. Vaikka sekvensointi suoritettiin automatisoidulla instrumentilla, on voinut tapahtua virheellistä toimintaa prosessin aikana.

Työn tarkoituksena oli sisäänajaa uusi menetelmä RT-PCR:n käyttöön. Menetelmä todettiin toimivaksi, koska geelijaolla saatiin näkyviin molemmista alueista halutun kokoiset bändit.

## 6 TULEVAISUUS

Työn tulosta käytetään tulevaisuudessa viruksen evolutiivisen kehityksen tutkimiseen. Sekvenssejä tutkimalla tullaan selvittämään miten viruksen 3Dpol ja VP1 alueet ovat vuosikymmenien aikana muuttuneet. Virukset voidaan jakaa eri genotyyppisiin. Tuloksista voidaan myös selvittää miten erimaiden, ja erimannerten, viruskannat vaihtelevat

## LÄHTEET

1. Aili Cui, Deshan Yu, Zhen Zhu, Lei Meng, Hui Li, Jianfeng Liu, Guiyan Liu, Naiying Mao, Wenbo Xu, An outbreak of aseptic meningitis caused by coxsackievirus A9 in Gansu, the People's Republic of China, Cui et al. Virology Journal 2010 7:72,
2. Outi Heikkilä, Petri Susi, Glyn Stanway and Timo Hyypiä, Integrin  $\alpha$ Vb6 is a high-affinity receptor for coxsackievirus A9, Journal of General Virology (2009), 90, 197–204,
3. E.C. McWilliam Leitch, H. Harvala, I. Robertson, I. Ubillos, K. Templeton, P. Simmonds, Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region, J Clin Virol. 2009 Feb;44(2):119-24. Epub 2009 Jan 8,
4. Williams CH, Kajander T, Hyypiä T, Jackson T, Sheppard D, Stanway G, Integrin  $\alpha$  v beta 6 is an RGD-dependent receptor for coxsackievirus A9, Department of Biological Sciences, University of Essex, Colchester CO4 3SQ, United Kingdom. [Viitattu online 09.10.2011] Saatavana osoitteessa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194773>
5. Enterovirus struct. VIPERdb - Virus Particle Explorer. [Viitattu online 09.10.2011] Saatavana osoitteessa: <http://www.picornaviridae.com/structures/enterovirus.htm>
6. Ilari Suominen, Pauli Ollikka, Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet, Hakapaino Oy, Helsinki 2006

## Sekvensointituloksia

>97-3526

GTAAC TCGGAAAGCATTCCCGCCCTCACAGCCGTTGAGACAGGGGCATACA  
TCACAAGTGACCCCGAGTGACACCATGCAA

ACCAGACACGTGAAGAATTATCATTCTCGCTCCGAATCCACTATARAAAATT  
TTCTTGGTAGGTCTGCCTGTGTTTACAT

GGAGGAGTATAAAACACAGACAACGATACCAATAAGAAGTATGTAGCGT  
GGCCAATCAACACCAAACAAATGGTTCAGA

TGCGCAGGAAATTGGAGATGTTCACTTACTTGAGGTTTGACATGGAAGTGA  
CTTTCGTGATTACAAGTCGGCAAGATCCT

GGGACCACTCTAGCTCAAGACATGCCAGTGTTAACACATCAGATCATGTAC  
GTACCACCTGGAGGGGCCCATCCCGGCTAA

GGTTGATGACTATGCATGGCAAACGTCCACAAACCCCAGCATCTTCTGGA  
CGGAAGGAAATGCGCCGGCGCGCATGTCTA

TCCCCTTCATTAGCATAGGGAATGCTTATAGTAACTTTTATGATGGTTGGTC  
GAATTTTCGATCAGAAGGGTTCATACGGG

TACAACACATTAAACAACCTAGGTCACATTTATGTGAGGCATGTGAGTGGG  
AGTAGCCCTCATCCTATCACGAGTACCAT

CAGAATATACTTCAAACCAAAGCACACTAGAGCCTGGGTGCCGCGGCCCC  
CACGACTATGTCAGTACAAGAAAGCATTYA

GCGTTGATTTTACACCMAACGCCCATTA CTGACACTAGAAAAGACATCAAC  
ACCGTAACCTCGATACAGAGWAGACGCCG

CGGCGATATGTCCACGCTAAATACCCACGGGGCGTTTCGGGCAGCAATCTG  
GAGCGG

>98-2685

GAGAGCGGTTGTACACGTGGCTGACACAATGCGMAGKGRASCGAGCAAC  
TCGGAGAGCATTCCCGCCCTCACAGCCGTTG

AGACAGGGGCATACATCACAAGTGACCCCGAGTGACACCATGCAAACCAGA  
CACGTGAAGAATTATCATTCTCGTTCTGAG

TCCACTATARAAAATTTTCTTGGTAGATCCGCCTGTGTTTATATGGAGGAGT  
ATAAACTACAGACAACGATACTAATAA

GAAGTTTGTAGCGTGGCCAATCAACACCAAACAAATGGTCCAGATGCGCA  
GGAAATTGGAGATGTTTACTTACTTGAGGT

TTGATATGGAAGTGACTTTCGTGATTACAAGTCGGCAAGATCCCGGAACCA  
CCCTAGCCCAAGACATGCCAGTGTTAACA

CATCAGATCATGTACGTACCACCTGGAGGGCCCATCCCGGCCAAGGTTGA  
TGACTACGCATGGCAAACGTCCACAAACCC

CAGCATCTTCTGGACGGAAGGAAATGCGCCGGCGCGCATGTCTATCCCCT  
TTATTAGCATAGGGAATGCTTATAGTAACT

TCTATGATGGGTGGTCAAATTTTCGATCAGAAGGGTTCATACGGGTACAACA  
CATTAAACAACCTAGGCCACATATACGTG

AGGCATGTGAGTGGGAGTAGCCCTCATCCTATCACGAGTACCATCAGAAT  
ATACTTCAAACCAAAGCACACTAGAGCCTG

GGTGCCGCGGCCCCCACGACTATGTCAGTACAAGAAAGCATTTAGTGTTG  
ATTTTACACCAACACCCATTACTGATACTA

GGAAAGACATTAACACCGTGACCTCGATACAGAGTRGACGCCGCGGCGAT  
ATGTCCGCGCTAAACACTCACGGGGCGTTT

GGGCAGCAATCTGGAGCGGTGTACGTGGGCAACTACAGGGTAGTGAACA  
GGCACCTCGCCACACACAATGATTGG

Liite1

>99-50551

AGGACAACAAGCTACAAGGTGATGTGGAGGAGGCSATTGAGAGGGGCAGTT  
GTGCACGTGGCTGACACAATGCGCAGKGGG

CCAAGCAACTCGGAAAGCATTCCCGCCCTCACAGCCGTTGAGACGGGGC  
ATACATCGCAAGTGACCCCGAGTGACACCAT

GCAGACCAGACACGTGAAGAATTATCATTCTCGCTCTGAGTCTACCATARA  
AAATTTCTTGGTAGGTCTGCCTGTGTTT

ACATGGAGGAGTATAAAACCACAGACAACGATACCAACAAGAAGTTTGTGG  
CGTGGCCAATCAACACCAAACAAATGGTT

CAAATGCGCAGGAAATTGGAAATGTTCACTTACTTGAGATTTGACATGGAG  
GTGACTTTTCGTGATCACAAGTCGGCAAGA

TCCTGGAACCACCCTAGCTCAAGACATGCCTGTGCTAACACATCAGATCAT  
GTACGTACCACCTGGAGGGGCCCATCCCAA

CCAAGGTTGATGACTACGCATGGCAAACGTCCACAAACCCCAGCATTTTCT  
GGACGGAAGGAAATGCACCGGCGCGCATG

TCTATCCCCTTTATTAGCATAGGGAATGCTTACAGTAACTTCTATGATGGGT  
GGTCGAATTTGACCAGAAGGGTTTCGTA

CGGATACAACACGTAAACAACCTAGGCCACATATATGTGAGGCATGTAAG  
TGGGAGTAGCCCTCATCCTATCACGAGTA

CCCATCAGAATATACTTCAAACCAAAGC